

Estudos preliminares da atividade inseticida de óleos essenciais de espécies de *Piper linneus* (*piperaceae*) em operárias de *Solenopsis saevissima* f Smith (*Hymenoptera: formicidae*), em laboratório

Raimundo Nonato Picanço Souto¹, Ana Yoshi Harada² e José Guilherme de Souza Maia³

1. Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Arthropodas, Universidade Federal do Amapá, Rodovia JK, Km 02, bairro Universidade, Macapá, Amapá, Brasil. E-mail: rnpsoouto@unifap.br

2. Coordenação de Pesquisas em Zoologia, Museu Paraense Emílio Goeldi, 66040-170 Belém, PA, e-mail: ayharada@museu-goeldi.br

3. Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal do Pará, 66075-900 Belém, PA, e-mail: gmaia@ufpa.br

RESUMO: Este estudo objetivou em caráter preliminar avaliar a atividade inseticida de óleos essenciais de *Piper aduncum* L., *P. callosum* Ruiz & Pav., *P. divaricatum* G. Mey., *P. marginatum* Jacq. var. *anisatum* e *P. marginatum* Jacq. var. *marginatum* em operárias adultas de *Solenopsis saevissima*, em laboratório. Para a avaliação da atividade inseticida por contato em superfície contaminada, foram utilizados papéis-filtro impregnados com 1 mL das concentrações 100, 500 e 1000 ppm dos óleos essenciais e da substância controle acetona. Nos períodos de 24 e 48 horas após o início dos experimentos foram registrados os números de formigas mortas. O percentual de mortalidade ocorrido em cada tratamento foi determinado utilizando-se a fórmula, % mortalidade = No. de mortos no controle - No. de mortos no tratamento / No. de mortos no controle x 100. Entre os óleos das cinco espécies de *Piper*, o melhor potencial inseticida foi constatado em *P. aduncum* com mortalidade média de 100% (1000 ppm), 85% (500 ppm) e 55% (100 ppm) em 24 horas e 100 % (1000 e 500 ppm) e 76,6% (100 ppm) em 48 horas. Atribui-se que a ação inseticida, conferida por *P. aduncum*, deve-se a composição química de seu óleo essencial, devido a presença marcante de dilapiol (50-97%).

Palavras-chave: controle. dilapiol. inseticidas vegetais. formiga- de- fogo.

ABSTRACTS: Preliminary studies of the insecticidal activity of essential oils of species *piper linneus* (*piperaceae*) in workers of *solenopsis saevissima* f smith (*hymenoptera: formicidae*), in the laboratory. This preliminary study aimed at assessing the insecticidal activity of essential oils *Piper aduncum* L., *P. callosum* Ruiz & Pav., *P. divaricatum* G. Mey., *P. marginatum* Jacq. var. *anisatum* and *P. marginatum* Jacq. var. *marginatum* in adult *Solenopsis saevissima* workers, in the laboratory. For the assessment of activity per contact insecticide in contaminated surface, were used filter papers-impregnated with 1 mL of concentrations 100, 500 and 1.000 ppm of essential oils and substance control acetone. In periods of 24 and 48 hours after the start of the experiments were registered numbers dead ants. The percentage of mortality occurred in each treatment was determined using the formula, % mortality = No. deaths in control-In. deaths in treatment/no. deaths in control x 100. Between oils of five species of *Piper*, the best potential insecticide was found in *P. aduncum* with average 100% mortality (1000 ppm), 85% (500 ppm) and 55% (100 ppm) in

24 hours and 100% (1000 and 500 ppm) and 76.6% (100 ppm) within 48 hours. Assigns the insecticidal action, conferred by *P. aduncum*, chemical composition, its essential oil, due to presence attractive dilapiol (50-97%).

Keywords: control, dilapiol, vegetable insecticides, fire ants.

1. Introdução

As formigas são insetos sociais abundantes e ocorrem, praticamente, em todos os ambientes terrestres, exceto nos pólos. Várias espécies se encontram associadas ao homem, estando presentes em residências, fábricas de alimentos, hospitais, escritórios, padarias, instituições de pesquisas, biotérios, zoológicos, museus e cabines de eletricidade. Nas residências, elas podem invadir e provocar danos em aparelhos eletro-eletrônicos. Também constituem um perigo potencial à saúde pública, quando a infestação se dá em hospitais, por apresentarem a capacidade de transportar microrganismos patogênicos, atuando como vetor mecânico (VINSON e MACKAY, 1990; FOWLER et.al.1993).

Alguns compostos de origem vegetal como o d-limoneno, as piretrinas, a rotenona, o óleo pínico e aguarrás têm demonstrado a atividade inseticida contra formigas. Os óleos cítricos com ingredientes ativos linalol e d-limoneno mostraram-se efetivos quanto à atividade letal em formigas (ELLIS et al. 1992; OLKOWSKI et al. 1991). A piretrina que age no sistema nervoso mata as formigas dentro de minutos a horas, podendo ser usada no controle de colônias *Solenopsis*. A rotenona age em tecidos respiratórios, junto com nervos, e músculos. A rotenona e o óleo (aguarrás) são relativamente lentos (dias a semana) e é aplicado encharcando os montículos (OLKOWSKI et al.1991).

Este estudo objetivou em caráter preliminar avaliar a atividade inseticida dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *P.*

callosum, *P. divaricatum*, *P. marginatum* e *P. marginatum* var. *marginatum*, em operárias adultas de *S. saevissima*, em laboratório.

2. Material e métodos

2.1. Formigas

As formigas utilizadas nos bioensaios foram provenientes de colônias mantidas em laboratório no Centro de Pesquisas Zoobotânicas e Geológicas do Instituto de Pesquisa Científicas do estado do Amapá (IEPA). Os indivíduos utilizados nos testes são todas operárias adultas da espécie *S. saevissima*.

2.2. Óleos essenciais

Os óleos essenciais utilizados neste estudo foram extraídos das plantas *Piper aduncum*, *P. callosum*, *P. divaricatum*, *P. marginatum* e *P. marginatum* var. *marginatum*.

2.3. Extração dos óleos essenciais

O processamento do material coletado para análise química e bioensaio dos óleos essenciais foi feito da seguinte forma: secagem à temperatura ambiente com ventilação natural, moagem, pesagem, hidrodestilação utilizando extratores de vidro tipo Clevenger, secagem do óleo essencial obtido, cálculos de rendimento e registro de dados, acondicionamento do óleo essencial em ampolas escuras, na ausência de oxigênio (fluxo de nitrogênio) e armazenamento em refrigerador à temperatura de 5°C.

2.4. Análise Química dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais obtidos para os testes foram analisados por cromatografia de gás acoplada à espectrometria de massas, utilizando: Cromatógrafo de Gás (CG) Varian, modelo 3400, equipado com coluna capilar de sílica fundida em fase ligada DB-5ms (30m x 0,26mm de d.i. e 0,25 µm de espessura do filme). Hélio foi usado como gás de arraste, ajustado para uma velocidade linear de 32 cm/s (1mL/min), medido a 100°C. A quantidade de amostra injetada para análise foi de 1µL no modo splitless a partir de uma solução, óleo essencial: hexano, na proporção 1:1000. A programação de temperatura foi iniciada a 60°C e aumentada a 3°C/min até 240°C, totalizando um tempo de 60 min. para cada análise de óleo essencial.

Espectrômetro de Massas (EM) Finnigan, modelo INCOS XL operou com Impacto Eletrônico (IE), usando uma energia de elétrons de 70 e V. Os parâmetros de aquisição foram programados com varredura completa na faixa de 30-400 ufm (unidade de fragmento de massas) em intervalo de um segundo.

A identificação dos constituintes voláteis em cada amostra de óleo essencial foi feita por comparações de seus espectros de massas e tempos de retenções de substâncias padrões existentes nas bibliotecas do SISTEMA INCOS. A identificação dos constituintes foi confirmada através de comparação de seus índices de retenção com os de substâncias padrão e da literatura (ADAMS, 1989; JENNINGS e SHIBAMOTO, 1980); tendo-se utilizado para o cálculo do índice de retenção a série homóloga dos *n*-alcanos nas mesmas condições operacionais.

2.5. Bioensaios

Os ensaios foram conduzidos em uma sala (3m x 4m) com condições climáticas controladas, temperatura de 25±2°C, umidade relativa do ar de 75± 5 % e 12 horas de fotoperíodo, localizada no Laboratório de Entomologia do Centro de pesquisas Zoobotânicas e Geológicas do IEPA, Macapá, Amapá.

O método utilizado seguiu o protocolo do papel filtro impregnado da (FAO, Método No. 15, 1974). Consiste na utilização de Placas de Petri de vidro (150 mm de diâmetro por 20 mm de altura) com tampa e papel filtro circular (com 150 mm de diâmetro) impregnado com a substância teste.

A escolha das concentrações 100, 500 e 1000 ppm dos cinco óleos essenciais de *Piper* e da substância controle acetona para início desta investigação foi baseada em trabalhos anteriores com a utilização de óleos essenciais de outras plantas em operárias de formigas *Solenopsis* spp (SHEPPARD, 1984; ELLIS et al., 1992; OLKOWSKI et al., 1991; VOGT et al., 2002).

Foi preparada uma solução estoque de 1000 ppm e dela obtidas as diluições utilizadas no experimento (100 e 500ppm) comuns a todos os cinco óleos. De cada concentração e do controle (acetona), foram realizadas três repetições, cada uma com 20 formigas operárias de tamanho grande, médio e pequeno. De cada óleo e de suas respectivas concentrações foi pipetado 1 mL em papel filtro individual e posteriormente secos ao ar e em seguida colocados em placas de petri. Após 30 minutos para total evaporação do solvente, em cada tratamento foram colocadas 20 formigas operárias da espécie em estudo. Para evitar a fuga das formigas, as paredes laterais das placas receberam uma camada de TEFLON-30. Durante os testes as

formigas foram alimentadas com mel a 10 %, larvas de *Tenebrio* spp e água. Após 24 e 48 horas da montagem do experimento, foi registrado o número de formigas mortas e retirando-os das placas para que não houvesse sobreposição de contagens na contagem subsequente.

2.6. Análise de dados

O percentual de mortalidade ocorrido em cada tratamento foi determinado utilizando-se a fórmula:

$$\% \text{ Mortalidade} = \frac{N^{\circ} \text{ de mortos no controle} - N^{\circ} \text{ de mortos no tratamento}}{N^{\circ} \text{ de mortos no controle}} \times 100$$

O critério utilizado para a seleção dos óleos essenciais e de suas concentrações para a realização de testes secundários, foi a implementação de um potencial inseticida com uma proporção de mortalidade média igual ou superior a 50% em operárias de *S. saevissima* em 48 horas.

3. Resultado e Discussão

O local de procedência das plantas, os constituintes químicos majoritários e o rendimento do óleo essencial de cada espécie de *Piper* encontram-se na Tabela 1 (em anexo).

Na tabela 2 estão demonstrados os dados referentes aos ensaios biológicos de averiguação da atividade inseticida de cada óleo testado em 24 e 48 horas de exposição.

Todos os óleos das cinco espécies de *Piper* apresentaram atividade inseticida em operárias de *Solenopsis saevissima*, sendo observada uma maior proporção de mortalidade em 1000 ppm, seguida por 500 ppm e 100 ppm.

Entre os óleos das cinco espécies de *Piper*, o melhor potencial inseticida foi constatado em *P. aduncum* com mortalidade média de 100% (1000 ppm), 85% (500 ppm) e 55% (100 ppm) em 24

horas e 100 % (1000 e 500 ppm) e 76,6% (100 ppm) em 48 horas. Atribui-se que esta ação inseticida, conferida por *P. aduncum*, deve-se a composição química de seu óleo essencial, devido a presença marcante de dilapiol (50-97%) (Maia *et al.*, 1998), já descrito como tendo atividade biológica (BASTOS e ALBUQUERQUE, 2004; POHLIT *et al.*, 2004). O dilapiol é utilizado como sinérgico de vários inseticidas naturais, incluindo o piretrum (MUKEERJEE *et al.*, 1979; BERTRAND, 1999; BERNARD *et al.*, 1990), e de vários carbamatos e organoclorados (HANDA e DEWAN, 1974). No trabalho de Roseli (2004), o óleo essencial de *Piper aduncum* foi submetido a fracionamento para obtenção de dilapiol puro. Este constituinte, na faixa de 98,5% foi testado contra operárias de *Solenopsis saevissima* obtendo-se 100% de mortalidade em 500 ppm (48 horas) e em larvas de *Anopheles marajoara* e *Aedes aegypti* com 100 % de mortalidade em 100 ppm (24 h).

O segundo melhor desempenho foi do óleo de *P. marginatum* com mortalidade média de 100% (1000 ppm), 60% (500 ppm) e 25% (100 ppm) em 24 horas de exposição e 100% (1000 e 500 ppm) e 70% (100 ppm) em 48 horas, seguido por *P. marginatum* var. *marginatum* com mortalidade média de 100% (1000 ppm), 85% (500 ppm) e 33% (100 ppm) em 24 horas e 100 % (1000 e 500 ppm) e 60% (100 ppm); *P. divaricatum* com mortalidade média de 100 % (1000 ppm), 58,3% (500 ppm) e 20% (100 ppm) em 24 horas e 100 % (1000 e 500 ppm) e 48,3% (100 ppm) em 48 horas e *P. callosum* com mortalidade média de 91,7% (1000 ppm), 45% (500 ppm) e 15% (100 ppm) em 24 horas e 100% (1000 ppm), 71,1 % (500 ppm) e 55% (100 ppm) em 48 horas.

4. Conclusão

▪ Todos os óleos das cinco espécies de *Piper* provocaram uma proporção de mortalidade média superior a 50%, portanto, aptos para a realização de ensaios secundários.

▪ O melhor desempenho quanto ao potencial inseticida foi obtido pelo óleo de *P. aduncum*, seguido por *P. marginatum*, *P. marginatum* var. *marginatum*, *P. divaricatum*, e *P. callosum*.

▪ Para todos os óleos das cinco espécies de *Piper* a concentração de 1000 ppm produziu 100% de mortalidade em apenas 24 horas. Na maioria dos óleos com 500 ppm foi obtido 100% de mortalidade em 48 horas.

5. Agradecimentos

As instituições Instituto de Pesquisa Científicas e Tecnológicas do estado do Amapá (IEPA), Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), Universidade Federal do Amapá (UFPA), Programa de Pós-graduação (PGZOOL), Ministério do Meio Ambiente (MMA), PROJETO TEAM (FADESP/MPEG/CI-BRASIL – Fundação Betty e Gordon Moore).

6. Bibliografia

ALMEIDA, R. R. P. **Isolamento, purificação, isomerização do dilapiol, componente majoritário do óleo essencial de *P. aduncum* para comprovação de sua atividade biológica.** Belém-Pa. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Pará. 117p. 2004

ADAMS R. P. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publ Corp., Carol Stream, IL, 1995.

BASTOS C.N., P. S. B. ALBUQUERQUE. Efeito do Óleo de *Piper aduncum* no Controle em Pós-Colheita de *Colletotricum musae* em Banana. **Fitopatol. Bras.** 29(5).555-557. 2004

BERNARD C.B., ARNASON J.T., PHILOGENE B.J.R. WANDDEL T. In-vivo effect of mixture of

allelochemicals on the life cycle of the European corn borer, *Ostrinia nubilis*. **Entomol. Exp. Appl.** 57:17-22. 1990

BERTRAND M.C. 1992. Etudes toxicocinetiques et synergiques de l'azadirachtine dihydrogénée chez la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilis*. Thèse de Maîtrise es Sciences. Université d'Ottawa, Ottawa, Canada. 1992.

ELLIS, BARBARA W. e FERN MARSHALL BRADLEY. 1992. The Organic Gardener's Handbook of Natural Insect and Disease Control: A Complete Problem-Solving Guide to Keeping Your Garden & Yard Healthy Without Chemicals. Emmaus, PA: Rodale Press. 187 p. 1992.

FAO. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pest to pesticide. Method for adult of method 15. **FAO Plant Protection** 22:127-137. 1974.

FOWLER, HG; BUENO, OC; SADATSUNE, T; MONTELLI, AC. Ants as potential vectors of pathogens in hospitals in the state of São Paulo, *Brazil. Insect Sci. Applic.*, vol. 14 (3), pp 367 - 370, 1993.

HANDA S.K.; DEWAN R.S. 1974. Evaluation of dillapiole and dihydrolapiole as synergists for pyrethrins in dust. Formulations. **Pyrethrum Post** 13(2):46-46. 1974.

JENNINGS W., SHIBAMOTO T. Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography, New York, Academic Press. 1980.

MAIA, J. G. S., ZOGHBI, M. G. B., ANDRADE, E. H. A., SANTOS, A. S., DA SILVA, M. H. L., LUZ, A. I. R. and BASTOS, C. N. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon Region, **Flavour Frag. J.**, 13:269-272. 1998.

MUKERJEE S.K., SAXENA V.S., TOMAR S.S. New methylenedioxyphenyl synergist for pyrethrins. **J. Agric. Food Chem.** 27(6):1209-1211. 1979.

OLKOWSKI, WILLIAM, SHEILA DAAR, AND HELGA OLKOWSKI. *Common-Sense Pest Control: Least-Toxic Solutions for Your Home, Garden, Pets and Community.* Newtown, CT: The Taunton Press. 1991.

SHEPPARD D.C. 1984. Toxicity of citrus peel liquids to the house fly and red imported fire ant. **J. Agric. Entomol.** 1(2):95-100. 1991.

POHLIT A.M., QUIGNARD E.L.J., NONOMURA S.M., TADEI W.P., HIDALGO A.F., PINTO A.C.S., SANTOS E.V.M., MORAIS S.K.R., SARAIVA R.C.G., MING L.C., ALECRIM

A.M., FERRAZ A.B., PEDROSO A.C., DINIZ E.V., FINNEY L.K., GOMES E.O., DON L.C., QUEIROZ MMA, HENRIQUE M.C., SANTOS M., LACERDA JÚNIOR O.S., PINTO P.S., SILVA S.G. GRAÇA Y.R. 2004. Screening of Plants Found in The State of Amazonas, Brazil for larvicidal activity *St. aegypti* larvSt. **Acta Amazonica**. 34(1), 97-105. 2004.

VOGT J.T; SHELTON T.G; MERCHANT M.E.; RUSSEL S.A; TANLEY M.J. APPEL A.G **Journal of Agric. And urb. Entomology**.19(3)159-171. 2002.

VINSON S.B. E MACKAY W.P. Effects of the fire Ant, *Solenopsis invicta*, on electrical circuits and equipment. In: *Applied Myrmecology: A World Perspective*. Eds. Robert K. Vander Meer, Klaus Jaffe, and Aragua Cedeno. Boulder: Westview Press, 496-503. 1990.

7. Anexos

Tabela 1. Local de procedência das plantas, rendimento e principais constituintes químicos dos óleos essenciais das cinco espécies de *Piper*.

Espécies vegetais	Local de procedência	Rendimento Óleo (%)	Constituintes majoritários	%
<i>Piper aduncum</i>	Belém-PA	2,8	Dilapiol	80,0
<i>P. divaricatum</i>	Breves-PA	2,6	Metileugenol	69,9
			Eugenol	13,8
<i>P. marginatum</i> var. <i>anisatum</i>	Belém-PA	0,7	Etilpiperonilcetona	19,0
			δ-3-Careno	39,0
<i>P. marginatum</i> var. <i>marginatum</i>	Manaus-AM	1,4	<i>trans</i> -Anetol	26,4
			n.i.	32,2
<i>P. callosum</i>	Marituba-PA	3,6	Safrol	44,7
			Metileugenol	10,9

Tabela 2. Mortalidade média de operárias de formigas *S. saevissima* expostas a três concentrações dos óleos essenciais de cinco espécies de *Piper*.

Óleo essencial	Conc (ppm)	Nº de formigas	% mortalidade média 24 horas	% mortalidade média 48 horas
P. aduncum	100	60	55,0	76,6
	500	60	85,0	100,0
	1000	60	100,0	100,0
Controle	0	60	0	0
P. callosum	100	60	15,0	55,0
	500	60	45,0	71,1
	1000	60	91,7	100,0
Controle	0	60	0	0
P. divaricatum	100	60	20,0	48,3
	500	60	58,3	100,0
	1000	60	100,0	100,0
Controle	0	60	0	0
P. marginatum	100	60	25,0	70,0
	500	60	60,0	100,0
	1000	60	100,0	100,0
Controle	0	60	0	0
P. marginatum var marginatum	100	60	33,0	60,0
	500	60	85,0	100,0
	1000	60	100,0	100,0
Controle	0	60	0	0